

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06054681 A**

(43) Date of publication of application: **01 . 03 . 94**

(51) Int. Cl

C12N 9/02
A61K 37/50
A61K 37/50
A61K 37/50

(21) Application number: **03163723**

(22) Date of filing: **07 . 06 . 91**

(71) Applicant:

L T T
KENKYUSHO:KK SEIKAGAKU
KOGYO CO LTD ASAHI GLASS
CO LTD ASAHI CHEM IND CO
LTD

(72) Inventor:

MIZUSHIMA YUTAKA
IGARASHI TOSHISATO
ABE TSUTOMU
INOMATA TOSHIHIDE
YASUDA ARATA

(54) **LECITHINIZED SUPEROXIDE DISMUTASE AND
MEDICINE CONTAINING THE SAME AS ACTIVE
INGREDIENT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To improve the stability of superoxide dismutase and strengthen the pharmacological activity thereof.

CONSTITUTION: The objective lecithinized superoxide dismutase is obtained by combining the superoxide dismutase through a chemical cross-linking agent composed of a linear dicarboxylic acid residue and the objective medicine comprises the lecithinized superoxide dismutase as an active ingredient.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-54681

(43)公開日 平成6年(1994)3月1日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/02		9359-4B		
A 6 1 K 37/50	A B C			
	A B E			
	A B G	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 7 頁)

(21)出願番号	特願平3-163723	(71)出願人	391043055 株式会社エルティーター研究所 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
(22)出願日	平成3年(1991)6月7日	(71)出願人	000195524 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
		(71)出願人	000000044 旭硝子株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目1番2号
		(71)出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
		(74)代理人	弁理士 泉名 謙治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レシチン化スーパーオキシドディスムターゼ及びそれを有効成分とする医薬

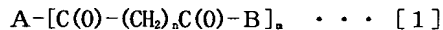
(57)【要約】

【目的】 スーパーオキシドディスムターゼの安定性を向上し、その薬理活性を強化する。

【構成】 スーパーオキシドディスムターゼとレシチンとを、直鎖状ジカルボン酸残基からなる化学的橋かけを介して結合してなる、レシチン化スーパーオキシドディスムターゼ、およびそれを有効成分とする薬剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記式〔1〕で表わされるレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。



ただし、

A：銅及び／又は亜鉛が配位した、111 位がセリンで示されるヒト由来のスーパーオキシドディスムターゼの残基

B：グリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンの、その2位の水酸基の水素原子を除いた残基

m：1以上の整数

n：2以上の整数

【請求項2】n が2～10の整数である、請求項1のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。

【請求項3】m が平均して1～16である、請求項1または2のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。

【請求項4】請求項1～3のいずれか一のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼを有効成分として含む医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、レシチン化スーパーオキシドディスムターゼ、およびそれを有効成分とする医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】薬物の効果を高め、副作用を減らす試みは、古くから行われてきているが、近年応用されて始めているものの一つとしてドラッグデリバリーシステム

(DDS)がある。DDSとは、薬物を必要とする部位へ、なるべく選択的に、必要な時間の間移行させ、それにより薬物の効果を高め全身的な副作用を大幅に減少させる試みである。

【0003】DDSに用いられるキャリアとしては種々のものがあり、例えばリポソームとリピッドマイクロスフェアを挙げることができる。リポソームは、天然に存在する脂質、例えばレシチン、コレステロールなどを有機溶媒に溶解し、超音波処理などで水に拡散させ、これに薬物を封入させたものである。一方、リピッドマイクロスフェアは、大豆油をレシチンとともに水に懸濁したものであり、レシチンがその表面にあり、内部に薬物が封入されている。

【0004】両者とも、薬物は主として物理的な結合により内部に封入されている。リポソームは、安定性が悪く、またリピッドマイクロスフェアは、封入する薬物が脂溶性であることが要求され、その上特殊な製造装置を使用する必要がある。

【0005】一方、スーパーオキシドディスムターゼ

(以下、これをSODと略記する)は、動物、植物、微生物などの生体内に広く分布し、遊離(フリー)の反応性に富む活性酸素であるスーパーオキシドアニオンラジ

カルを分解する酵素として知られている。薬物の面では、抗リウマチ剤、心筋梗塞又は臓器移植の際の使用、抗血栓剤の使用後に生じるラジカルの除去など種々の炎症への適用が期待されている(抗炎症剤としては、ファルマシア、17巻、411 頁(1981年)参照)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】SODを静脈内投与した場合、細胞親和性が低く、かつその血中半減期は僅か4～6分とされており、SODは速やかに尿中に排泄される。SODの血中半減期を増大させるために、SODをフィコール、ポリエチレングリコール、ラットアルブミン、デキストランで修飾し、巨大分子化させることが試みられてきた。

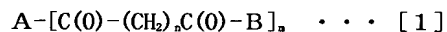
【0007】しかし、フィコールまたはポリエチレングリコールで修飾されたSODはSODの酵素活性が大幅に低下しかつ細胞親和性が低いこと、またラットアルブミンで修飾されたSODには抗原性があることが報告されている。また、デキストランによる修飾では、SODの抗炎症作用の増強が認められるが、免疫原性を抑制する効果は認められていない。

【0008】従来知られている種々の修飾SODは、すでに報告されている上記の理由、また巨大分子化に伴う組織内浸透性の低下などの点でいずれも実用上問題があった。従って、いずれの修飾SODも臨床応用には至っていないのが現状である。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これら従来のものとは全く異なり、しかも優れた効果を挙げることができるSODのDDS化について検討した結果、下記特定のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼを見出した。本発明は、この特定のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼである。即ち、本発明は、下記の特定の化学的橋かけを経てレシチンに結合した特定のスーパーオキシドディスムターゼ、およびそれを有効成分とする薬剤である。

【0010】下記式〔1〕で表わされるレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。



ただし、

A：銅及び／又は亜鉛が配位した、111 位がセリンで示されるヒト由来のスーパーオキシドディスムターゼの残基

B：グリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンの、その2位の水酸基の水素原子を除いた残基

m：1以上の整数

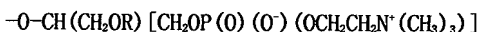
n：2以上の整数

【0011】本発明のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼは、従来のSODとは生物体内分布、細胞親和性が著しく異なり、かつ残存活性が90%以上の極めて均一な活性を保持したものが得られ、従ってSODの薬

理活性の強化、副作用の低下、吸収促進が期待できる。

【0012】本発明のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼは、通常、リゾレシチンの残基に化学的橋かけ剤を結合させたレシチン誘導体を、銅及び/又は亜鉛が配位した、かつ111位がセリンで示されるヒト由来のスーパーオキシドディスムターゼ（以下、Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SOD という）に1個以上結合させて得られる。

【0013】Bは、下記式〔2〕で表わされるグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンの、その2位の水酸基の水素原子を除いた残基である。



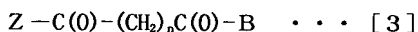
・・・〔2〕

上記式〔2〕において、Rは脂肪酸残基（アシル基）であり、特に炭素数8～30の飽和～不飽和の脂肪酸残基が好ましい。特に好ましいRは、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、その他の炭素数14～22の飽和脂肪酸残基である。

【0014】上記式〔1〕中、 $-C(O)-(CH_2)_nC(O)-$ は化学的橋かけ剤の残基を表わす。この化学的橋かけ剤の残基は、 $HO-C(O)-(CH_2)_nC(O)-OH$ で表わされる直鎖状ジカルボン酸、およびその無水物、そのエステル、その他のそのジカルボン酸の反応性誘導体からなる化学的橋かけ剤の両水酸基を除いた残基である。以下、この残基を化学的橋かけという。

【0015】この化学的橋かけは、上記リゾレシチン残基とエステル結合で結合している。また化学的橋かけの他端は、Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODのアミノ基とアミド結合などにより直接結合していると考えられる。この式において、nは2以上の整数であり、 $-(CH_2)_n-$ は直鎖アルキレン基を表わし、特にnが2～10の直鎖状アルキレン基が好ましい。

【0016】上記式〔1〕で表わされるレシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODは、例えばCu-Zn型組換えh-SODと式〔3〕のリゾレシチン誘導体とにより製造される。



【0017】上記式中、B、nは式〔1〕の場合と同様である。式〔3〕中Zは水酸基、または活性エステルを形成する基からカルボニル基を除いた基を表わす。例えば、p-ニトロフェノール、1,3,5-トリクロロフェノール、ペンタフルオロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシピペリジン、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド、8-ヒドロキシキノリン、2-ヒドロキシピリジンなどの水酸基含有化合物の水酸基の水素原子を除いた基である。活性エステル体の合成法については公知の方法を用いることができる（泉屋他、「ペプチド合成の基礎と実験」（1985）丸善（株）発行、を参照）。

【0018】式〔3〕で表わされるリゾレシチン誘導体とCu-Zn型Ser¹¹¹h-SODとの結合方法としては、例えば以下のものが挙げられる。

【0019】式〔3〕においてZが水酸基の場合はカルボジイミド法により行われる。カルボジイミド類としては、ジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。例えば、1～10wt%の〔3〕の化合物の水溶液を塩酸でpH4～6に調製し、室温または0℃で1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを加え、再度pHを4～6に調製する。SODを加え室温または0℃で1時間pHを4～6に保持しその後5～20時間攪拌し、レシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODを得る。

【0020】式〔3〕においてZが活性エステルを形成する基からカルボニル基を除いた基を表わす場合は、Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODと直接結合させることができる。反応はホウ酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、重炭酸ナトリウムなどの塩の水溶液中でレシチン誘導体とCu-Zn型Ser¹¹¹h-SODを混合することによって行われる。

【0021】必要に応じて、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリド、N,N-ジメチルアセトアミド、スルホラン、ジメチルスルホキシド、アセトン、1,4-ジオキシサン、メタノールなどの有機溶媒を加えておくことができる。反応温度は-20～50℃が好ましく、0～20℃が更に好ましい。反応時間は反応温度、混合方法により異なるが通常2～24時間である。

【0022】式〔3〕で表わされるレシチン誘導体の仕込み量はCu-Zn型Ser¹¹¹h-SODのアミノ基に対して0.2～8倍モル量が適当である。この仕込み比によってCu-Zn型Ser¹¹¹h-SODに結合させるレシチン誘導体（式〔3〕）の分子数を調整することができる。

【0023】このようにして得られた反応液にはレシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODと未反応Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SOD、及び未反応レシチン誘導体が共存するが、反応液をゲル濾過及びイオン交換カラムクロマトグラフィーに付することにより所望のレシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODを得ることができる。またこのようにして得られたレシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODはCu-Zn型Ser¹¹¹h-SODに種々の分子数のレシチン誘導体が結合して得られたものの混合物である。

【0024】有効成分化合物としてCu-Zn型Ser¹¹¹h-SODに結合するレシチン誘導体の分子数が均一であるようなレシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODが所望される場合には、前記の方法により得られるレシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODを更にゲル濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどの操作に付することにより所望のレシチン化Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SODを得ることが可能である。Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SOD1分子あたりのレシチン結合数（式〔1〕におけるm）は、特に限定されるものではないが、1～16が好ましく、特に1～10が好ましい。

【0025】式〔3〕の化合物の製造法としては、下記

10

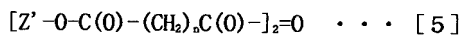
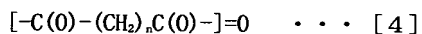
20

30

40

50

式〔4〕で表わされる酸無水物をH-Bで表わされるリゾレシチンに反応させる方法、または下記式〔5〕で表わされるジカルボン酸ハーフエステル無水物をH-Bで表わされるリゾレシチンに反応させる方法により得られる。



【0026】ここでB、nは式〔1〕の場合と同様である。Z'はカルボキシル基の保護基、例えば、アルキル基、メトキシメチル基、ベンジル基、フェナシル基、t-ブチルジメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリメチルシリル基などを表わす。

【0027】これら酸無水物やハーフエステル無水物を用いて式〔3〕の化合物を製造する反応は、通常溶媒中で行われ、必要により有機塩基を共存させて行う。反応溶媒としては、例えば、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素が用いられ、有機塩基としては、例えば、ピリジン、ピペリジン、トリエチルアミン、4-ジメチルアミノピリジン、4-ピペリジノピリジンなどが用いられる。反応温度は20~80℃が好ましく40~60℃が更に好ましい。反応時間は、通常2~24時間である。

【0028】式〔5〕の製造方法としては、当該するカルボン酸ハーフエステルをベンゼン、トルエン、クロロホルム、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、などの溶媒中でカルボジイミドと混合させることにより得られる。カルボジイミドとしては、例えば、ジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。反応温度は、-20℃から溶媒還流温度までの範囲を用いることができるが、好ましくは、0℃から室温程度の温度を用いる。

【0029】本発明で用いるCu-Zn型Ser¹¹¹h-SODは、例えばヒト由来のスーパーオキシドディスムターゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列について、部位特異的変異法に基づき、111位のシステイン残基をセリン残基に変換して得られる(特開昭62-130684号)。

【0030】本発明における製剤の形態としては注射剤、直腸吸収剤、経鼻吸収剤などが挙げられる。注射剤は、例えば本有効成分を緩衝剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤と適量に溶解した注射用蒸留水に溶解し、除菌フィルタを通して無菌化したものをアンプルに分注するか、または本有効成分を増量剤、安定化剤とともに注射用蒸留水に溶解し、除菌フィルタを通して無菌化したものをアンプルに分注するか、バイアル瓶に分注して凍結乾燥することにより調製される。

【0031】以下に本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限られるものではない。

【0032】

【実施例】

【合成例1】

9-ベンジルオキシカルボニル-1-ノナン酸無水物の合成
9-ベンジルオキシカルボニル-1-ノナン酸15g(51mmol)をベンゼン50mlに溶解させ0℃に冷却し、DCC(1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド5.8g(28mmol))を加え、室温で15時間攪拌した。不溶物をセライトで濾過し、減圧濃縮して、標記化合物を得た。

【0033】【合成例2】

2-(9-ベンジルオキシカルボニルノナノイル)リゾレシチンの合成

10 グリセロールの2位が水酸基であるリゾレシチン3g(5.9mmol)のクロロホルム-ピリジン(80ml/20ml)懸濁液に、DMAP(N,N-ジメチルアミノピリジン)2.16g(17.7mmol)、9-ベンジルオキシカルボニル-1-ノナン酸無水物10.0g(17.7mmol)を加え、60℃で15時間攪拌した。その後反応液を減圧濃縮し、残渣にクロロホルム:メタノール:水=4:5:1(10ml)を加えて溶解し、同液にて平衡化したイオン交換カラム(Dowex 50W-X8)に通した。

【0034】TLCにより目的化合物を分画し、溶媒を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムにより精製し、標記化合物3.91g(5.0mmol, 85%)を得た。

¹H-NMR(CDCl₃)

0.84(t, 3H), 1.20(brs), 1.50-1.70(brs, 6H), 2.20-2.40(brs, 6H), 3.38(s, 9H), 3.80-4.00(m, 4H), 4.20-4.40(m, 4H), 5.10(s, 2H), 5.20(m, 1H), 7.30(m, 5H)。

【0035】【合成例3】

2-(9-ヒドロキシカルボニルノナノイル)リゾレシチンの合成

30 合成例2で得られた2-(9-ベンジルオキシカルボニルノナノイル)リゾレシチン3.91g(5.00mmol)をメタノール-水(225ml/25ml)に溶解させ、水酸化パラジウム3.0gを加えた。水素置換後15時間1気圧、室温で攪拌した。セライトで濾過し減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムにより精製して、標記化合物2.37g(3.41mmol, 61%)を得た。

【0036】【合成例4】

2-(9-ヒドロキシカルボニルノナノイル)リゾレシチンの活性エステル体の合成

40 合成例3で得られたカルボン酸2.0g(2.98mmol)をジクロロメタン50mlに溶解させて0℃に冷却し、N-ヒドロキシスクシンイミド343mg(2.98mmol)、テトラゾール209mg(2.98mmol)をこの順で加えた。次にDCC769mg(3.73mmol)をジクロロメタン8mlに溶解した。溶液をゆっくり滴下し、室温で15時間攪拌した。不溶物をセライトで濾過し、活性エステル体のジクロロメタン溶液を得た。

【0037】【合成例5】

11-ベンジルオキシカルボニル-1-ウンデカン酸無水物の合成

50 合成例1と同様に11-ベンジルオキシカルボニル-1-ウンデカン酸より合成した。

【0038】[合成例6]

2-(11-ベンジルオキシカルボニルウンデカノイル) リゾレシチンの合成

合成例2と同様に合成例5で得られた酸無水物より合成した。

【0039】[合成例7]

2-(11-ヒドロキシカルボニルウンデカノイル) リゾレシチンの合成

合成例3と同様に合成例6で得られたベンジルエステル体より合成した。

【0040】[合成例8]

2-(11-ヒドロキシカルボニルウンデカノイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

合成例4と同様に合成例7で得られたカルボン酸より合成した。

【0041】[合成例9]

6-ベンジルオキシカルボニル-1-ヘキサン酸無水物の合成

合成例1と同様に6-ベンジルオキシカルボニル-1-ヘキサン酸より合成した。

【0042】[合成例10]

2-(6-ベンジルオキシカルボニルヘキサノイル) リゾレシチンの合成

合成例2と同様に合成例9で得られた酸無水物より合成した。

【0043】[合成例11]

2-(6-ヒドロキシカルボニルヘキサノイル) リゾレシチンの合成

合成例3と同様に合成例10で得られたベンジルエステル体より合成した。

【0044】[合成例12]

2-(6-ヒドロキシカルボニルヘキサノイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

合成例4と同様に合成例11で得られたカルボン酸より合成した。

【0045】[合成例13]

2-(4-ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの合成

合成例3と同様に無水グルタル酸より合成した。精製はODS(オクタデシルシラン)を充填したカラムにより行った。

¹H-NMR (CDCl₃)

0.84(t, 3H), 1.20(brs), 1.52-1.60(brs, 2H), 1.80-1.95(m, 2H), 2.20-2.42, (m, 6H), 3.35(s, 9H), 3.78(m, 4H), 3.90-4.35(m, 4H), 5.20(m, 1H).

【0046】[合成例14]

2-(4-ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

合成例4と同様に合成例13で得られたカルボン酸より合成した。

【0047】[実施例] 上記合成例で製造した化合物を用いてレシチン化 Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SOD を下記のA~Cの方法を用いて製造した。

【0048】方法A: 活性エステル溶液のジクロロメタンを留去し、50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解した Cu-Zn型Ser¹¹¹h-SOD として、銅及び亜鉛が配位した、111位がセリンで示されるヒト由来のスーパーオキシドディスムターゼ(以下r-h-SOD)を添加し、0℃で1時間、更に室温で2時間反応させる。反応液を濾過し、セファクリルS-300(ファルマシア社製)を担体としたゲル濾過カラムに付し、反応緩衝液と同一の緩衝液で溶出する。次いで、レシチン化r-h-SOD溶出分画を集め、限外濾過により濃縮する。

【0049】方法B: 活性エステル溶液のジクロロメタンを留去し、DMFに溶解させた。これを50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に添加し、不溶物を濾過後同一緩衝液に溶解して0℃に冷却したr-h-SOD溶液に滴下する。この時r-h-SOD溶液にDMFを50%加えておく。0℃で15時間攪拌後、方法Aと同様に精製する。

20 【0050】方法C: 50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解したr-h-SOD溶液に、20%のDMFを加え0℃に冷却し、方法Bと同様に調製した活性エステルのDMF溶液をゆっくりと滴下する。0℃で15時間攪拌後、方法Aと同様に精製する。

【0051】[実施例1]

r-h-SOD1分子あたりレシチン誘導体が平均2個結合したレシチン化r-h-SODの合成

50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解させたr-h-SODと、r-h-SODの全アミノ基に対して0.4倍モル量の合成例4で合成した活性エステルとを方法Aに従って反応させた。反応溶液をゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。タンパク質濃度をローリー法(Lowry, O. h. ら, (1951). J. Biol. Chem., 193, 265)、r-h-SODの残存アミノ基をTNBS法(トリニトロベンゼンスルホン酸塩、Goodwin, J. F. ら, (1970). Clin. Chem., 16, 24)でおこなうことによりr-h-SOD1分子あたりのレシチン誘導体の結合数を求めたところ、平均2.0個であった。

【0052】[実施例2]

40 r-h-SOD1分子あたりレシチン誘導体が平均4個結合したレシチン化r-h-SODの合成

50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解させたr-h-SODと、r-h-SODの全アミノ基に対して0.8倍モル量の合成例14で合成した活性エステルとを方法Bに従って反応させた。実施例1と同様に精製し、r-h-SOD1分子当たりのレシチン誘導体の結合数を求めたところ、平均4.0個であった。

【0053】[実施例3]

r-h-SOD1分子あたりレシチン誘導体が平均8個結合したレシチン化r-h-SODの合成

50 50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解させたr-h-SODと、r

-h-SODの全アミノ基に対して2.0 倍モル量の合成例8で合成した活性エステルとを方法Cに従って反応させた。実施例1と同様に精製し、r-h-SOD 1分子当たりのレシチン誘導体の結合数を求めたところ、平均 8.0個であった。

【0054】 [実施例4]

Forssman抗血清による呼吸抵抗に及ぼすレシチン化 r-h-SODの抑制効果

Hartley 系雌性モルモット (体重 280g ~390g) を日本医科学動物資材研究所より購入し、実験に用いた。

【0055】呼吸抵抗は Mead らのオッシレーション法を一部改変したモルモット呼吸抵抗測定装置 (Type PMR-2、シズメメディカル) を用い、無麻酔、自発呼吸下にて測定した。すなわち、プラスチック製チャンバーボックス内にモルモットを入れ、頭部をボックス外に出し、ボックス内を密閉した後、20Hzの正弦波を増幅器およびスピーカーで体表面に加えた。この時生ずる気流速度 (ΔV) は、円錐型ゴムマスクの先端の400 メッシュスクリーンを通過して生ずる圧差をポリグラフ上に記録することにより求め、同時にボックス内圧と口腔内圧との差 (ΔP) も求め、 $\Delta P / \Delta V$ より呼吸抵抗値 (R_{rs}) を算出した。表示した値はForssman抗血清惹起前の呼吸抵抗値からの増加率で表わした。

【0056】惹起物質として、40倍希釈したforssman抗血清 (抗ヒツジ赤血球血清、cappel) を1ml/kg 耳静脈より投与し、30分間経時的に呼吸抵抗を測定した。被験薬剤として、注射用生理食塩液 (対照群)、それぞれ注射用生理食塩液に溶解して3000U/mlとし、r-h-SODを 3000U/kg 含む混合液、実施例2で合成したレシチン化 r *

*-h-SODを 3000U/kg 含む混合液、及び r-h-SOD 3000U/kg と合成例13で合成した化合物 (2-(4-ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチン) 123 μ g/kgとを含む混合液をそれぞれ惹起5分前より3ml/kg耳静脈より投与した。

【0057】統計学的処理として Mann-Whitney のU検定を用いて有意差検定を行った。P<0.05 を有意差ありと判定した (図1参照)。この試験結果を図1に示す。その結果より、実施例2のレシチン化 r-h-SOD 3000 U/kg投与群は control (非投与群) に対して P<0.01 で差が見られ効果があったと判定された。また、r-h-SOD 3000 U/kg 投与群と比較しても全ての測定点において P<0.05 で差が見られ、実施例2のレシチン化 r-h-SODは、r-h-SODよりフリーラジカルを有意に低減することから、効果的であったと判定された。

【0058】以上のように、実施例2のレシチン化 r-h-SODは、forssman抗血清によるモルモットの呼吸抵抗に対して有意な抑制効果が見られた。また、レシチン化 r-h-SODをモルモット (1群5匹) に6000U/kg静脈注射した結果、いずれも死亡例はみられなかった。

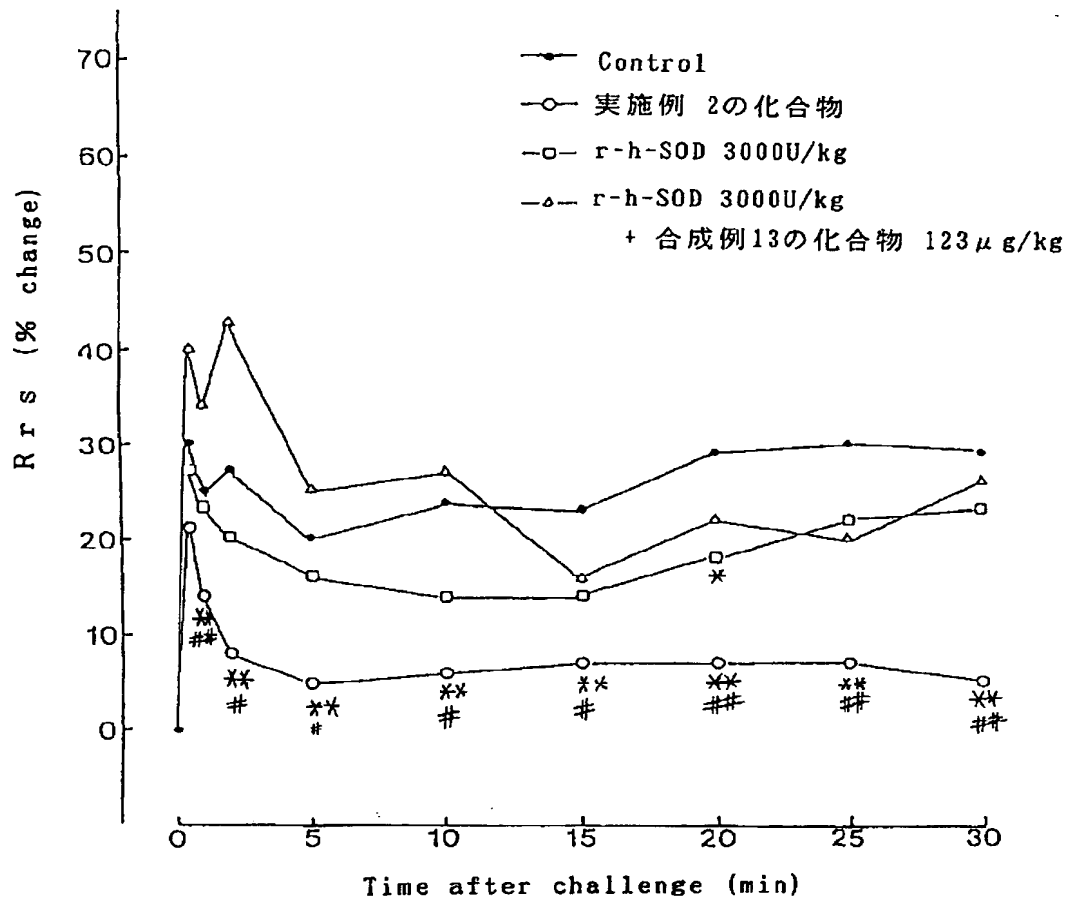
【0059】

【発明の効果】本発明のレシチン化スーパーオキシドデイスムターゼは、スーパーオキシドデイスムターゼと化学的橋かけを経てレシチンに結合させたものである。従来の修飾体と比較すると生体内分布、細胞親和性が著しく異なることが期待でき、薬理活性の強化が図られたという効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例4の試験結果を示すグラフ

【図1】



P<0.05 vs Control

P<0.01 vs Control

P<0.05 vs r-h-SOD 3000U/kg

P<0.01 vs r-h-SOD 3000U/kg

フロントページの続き

(72)発明者 水島 裕

東京都世田谷区梅丘一丁目1番11号

(72)発明者 五十嵐 理慧

神奈川県川崎市多摩区南生田三丁目3番12号

(72)発明者 阿部 力

静岡県三島市芙蓉台1丁目16-18

(72)発明者 猪股 俊秀

東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号
生化学工業株式会社内

(72)発明者 安田 新

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内